

中药研究

骨松强骨颗粒的醇提取工艺研究

杜志谦^{1,2} 牛琼琼² 夏华玲¹

(1 河南省洛阳正骨医院中心实验室, 洛阳, 471002; 2 河南中医学院, 郑州, 450008)

摘要 目的: 优选骨松强骨颗粒的醇提最佳工艺。方法: 以提取液中淫羊藿苷含量, 人参皂苷 R_{g1} 含量及总固体得率为指标, 采用正交实验法, 优选醇提工艺。结果: 处方药材的最佳醇提工艺为 70% 乙醇 10 倍量, 提取 3 次, 1.5 h/次。结论: 优选的提取工艺稳定可行。

关键词 正交实验法; 骨松强骨颗粒; 醇提工艺

Study on the Alcohol Extraction Process for Gusong Qianggu Granule

Du Zhiqian^{1,2}, Niu Qiongqiong², Xia Hualing¹

(1 Henan Luoyang Orthopedic Hospital, Luoyang 471002, China; 2 Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

Abstract Objective: To optimize the alcohol extraction process of GuSong QiangGu Granule. **Methods:** Orthogonal test was employed for selecting the optimum of alcohol extraction process by the indexes of the contents of ginsenoside R_{g1} and total solid matters. **Results:** Ten times amount of 70% ethanol concentration, extracting 3 times with 1.5 hours for each time was considered the optimum alcohol extraction process of Gusong Qianggu Granule. **Conclusion:** The optimum alcohol extraction process condition was stable and feasible.

Key Words Orthogonal test; GuSong QiangGu Granule; Alcohol extraction process

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.11.028

骨松强骨颗粒处方是河南省洛阳正骨医院的经验方, 由淫羊藿、三七、黄芪、骨碎补、葛根、附子、鹿角霜、何首乌组成, 具有益气补肾、强筋壮骨、温阳通脉、理气止痛作用。该处方在临床应用 10 余年, 疗效显著, 安全性高, 按新药开发拟制成颗粒剂。用于治疗原发性、继发性骨质疏松及骨软化症。根据所含的化学成分和药理作用结合功能主治, 淫羊藿、三七、骨碎补、葛根 4 种药材采取醇提的方法。淫羊藿补肝肾, 强筋骨^[1]。淫羊藿所含的淫羊藿苷可促进骨细胞的分化成熟, 促进成骨细胞的增殖^[2], 为治疗骨质疏松的有效化学成分^[3]。三七为贵重药材, 三七所含的人参皂苷 R_{g1} 为其主要成分^[4], 且含量较高。人参皂苷 R_{g1} 可增强机体免疫力^[5]。因此, 以淫羊藿苷含量和人参皂苷 R_{g1} 的含量及总固体得率为指标来优选提取条件, 从而为制定生产工艺提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 series 液相色谱系统(美国安捷伦), XS205DU 电子分析天平(瑞士梅特勒), HH-6 金坛市科兴仪器厂水浴锅。

1.2 试药 淫羊藿、三七等药材均购自洛阳康鑫中药饮片有限公司, 经河南中医学院董成明教授鉴定符合

《中华人民共和国药典》2010 版一部规定; 淫羊藿苷对照品(110737-200415)、人参皂苷 R_{g1} 对照品(703-8903)购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇为色谱纯, 其余为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 醇提液的制备 采用加热回流的提取方法^[6], 选用 $L_9(3^4)$ 正交进行实验, 以加醇量(A), 提取时间(B), 提取次数(C), 醇浓度(D)为考察因素, 进行 4 因素 3 水平的正交实验。因素水平见表 1, 一次称取处方量药材 50 g, 分别称取药材共 9 份, 按表 2 加醇液提取, 药液经过滤即得 1~9 号样品。

表 1 因素水平表

水平	因素			
	加水量(倍)	煎煮时间(h)	煎煮次数(次)	醇浓度(%)
A	B	C	D	
1	10	1	1	50
2	12	1.5	2	60
3	14	2	3	70

2.2 淫羊藿苷含量的测定^[7]

2.2.1 色谱条件^[8-9] 色谱柱安捷伦 C_{18} 柱; 乙腈: 水(28:72)为流动相; 检测波长 270 nm; 柱温 35 °C; 理论塔板数淫羊藿苷峰计算应不低于 1500。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取淫羊藿苷 1.9 mg 对照品,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,制成 0.19 mg/mL 的溶液,分别精密吸取 0.1 mL,0.2 mL,0.3 mL,0.4 mL,0.5 mL,0.6 mL,0.7 mL 上述溶液,用甲醇分别稀释至 1 mL。过滤后分别吸取 20 μ L 注入液相色谱仪。按上述色谱条件测峰面积。以淫羊藿苷的浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(Y)为纵坐标线性回归,得回归方程为 $Y = 39532X + 66.986$, $R^2 = 0.9998$,表明淫羊藿苷在 0.019 ~ 0.133 mg/mL 范围内线性良好。

2.2.3 供试品溶液的制备^[10] 按处方量称取药材提

取,精密移取提取液 2 mL,蒸干,加稀乙醇,定容至 10 mL。

2.2.4 对照品溶液的制备 取淫羊藿苷对照品 1.6 mg,加甲醇定容至 10 mL 容量瓶中,制成每 0.16 mg/mL 的溶液。

2.2.5 阴性溶液的制备 称取处方量缺淫羊藿的其余药材提取,照供试品的制备方法制备阴性溶液。

2.2.6 含量测定 分别精密吸取过 0.45 μ m 滤膜的对照品溶液,供试品溶液、阴性溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪。HPLC 图见图 1,结果见表 2。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验表

实验号	因素				结果			综合评分
	A	B	C	D	淫羊藿苷含量(mg/g)	人参皂苷 R_{g1} 含量(mg/g)	总固体得率(%)	
1	1	1	1	1	0.0646	0.2861	3.17	67.8196
2	1	2	2	2	0.1013	0.2561	3.59	81.2335
3	1	3	3	3	0.0791	0.4064	4.13	89.6715
4	2	1	2	3	0.0642	0.2319	3.10	62.0145
5	2	2	3	1	0.0878	0.2186	4.48	76.185
6	2	3	1	2	0.0641	0.1269	2.71	49.8994
7	3	1	3	2	0.0965	0.1992	4.28	76.818
8	3	2	1	3	0.0577	0.3482	3.02	70.5376
9	3	3	2	1	0.0660	0.1496	4.08	58.9999
K_1	79.575	68.884	62.752	67.668				
K_2	62.700	75.985	67.416	69.317				
K_3	68.785	66.190	80.892	74.075				
R	16.875	9.795	18.14	6.407				

注:综合评分 = (淫羊藿苷含量/淫羊藿苷最大含量) $\times 0.4 \times 100$ + (人参皂苷 R_{g1} 含量/人参皂苷 R_{g1} 的最大含量) $\times 0.4 \times 100$ + (总固体得率/最大总固体得率) $\times 0.2 \times 100$ 。

2.3 三七中人参皂苷 R_{g1} 含量测定^[11]

2.3.1 色谱条件^[12-13] 色谱柱安捷伦 C_{18} ;乙腈为流动相 A,水为流动相 B;检测波长为 203 nm,柱温 35℃;流动相比例如下图表 3,理论板数按人参皂苷 R_{g1} 算应不低于 4000。

表 3 流动相比例

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0 ~ 6	21	79
6 ~ 28	21 ~ 26	79 ~ 74

2.3.2 标准曲线的绘制 精密称取人参皂苷 R_{g1} 标准品 12.5 mg,放入 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,制成 1.25 mg/mL 的溶液,分别精密吸取 0.1 mL,0.2 mL,0.3 mL,0.4 mL,0.5 mL,0.6 mL,0.7 mL 的上述溶液加甲醇至 1 mL。分别精密吸取 20 μ L,按上述色谱条件注入液相色谱仪。以人参皂苷 R_{g1} 的浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标线性回归,回归方程为 $Y = 7421.7X + 105.86$, $R^2 = 0.9997$,表明人参皂苷 R_{g1} 在 0.125 ~ 0.875 mg/mL 范围内线性良好。

2.3.3 供试品溶液的制备^[14] 按处方量称取药材 50

g 提取,精密量取乙醇提取液 10 mL,蒸干加 20 mL 水溶解,水溶液用水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,弃水液,用正丁醇饱和的氨试液洗涤 2 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和的水液洗涤 1 次,每次 60 mL,取正丁醇层,蒸干,用甲醇溶解并定容至 10 mL 容量瓶中。

2.3.4 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 R_{g1} 对照品 4.7 mg,加甲醇定容至 10 mL 容量瓶中。制成含人参皂苷 R_{g1} 0.47 mg/mL 的溶液。

2.3.5 阴性溶液的制备 按处方量称取缺三七的其余药材提取,照供试品的方法制备阴性溶液。

2.3.6 含量测定 精密吸取过 0.45 μ m 滤膜的对照品溶液,供试品溶液、阴性溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪。HPLC 图见图 2,结果见表 2,方差分析见表 4。

2.4 总固体得率的测定^[15] 精密量取样品液 30 mL 至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后在 105℃ 干燥箱中干燥 5 h,于干燥器内冷却至室温,待恒重时精密称定,计算总固体得率,见表 2。

2.5 结果 分析极差值知因素对结果影响大小顺序

为:煎煮次数>加水量>煎煮时间>乙醇浓度。由方差分析知各影响因素对结果影响都不显著,由直观分

析知最佳组合为 $A_1B_2C_3D_3$,即10倍醇液,每次煎煮1.5 h,煎煮3次,乙醇浓度为70%。

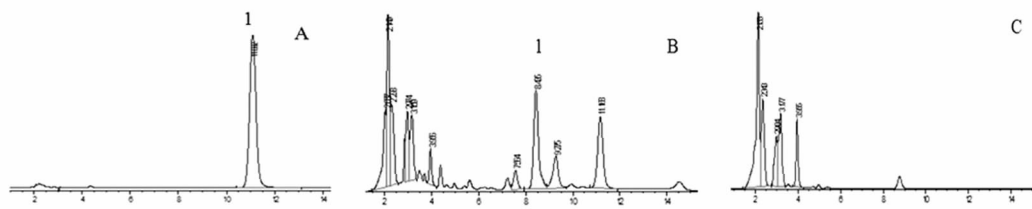


图1 为淫羊藿的HPLC图(注:A为淫羊藿苷的对照品溶液;B为样品溶液;C为阴性溶液;1为淫羊藿苷)

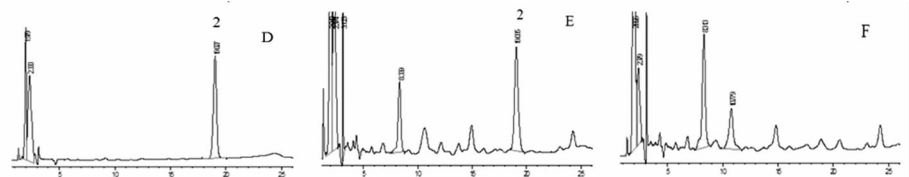


图2 三七的HPLC图(D为三七中人参皂苷 R_{g_1} 的对照品溶液;E为样品溶液;F为阴性溶液图;2为人参皂苷 R_{g_1})

表4 方差分析表

因素	A	B	C	误差
离差平方和	438.225	153.629	532.375	66.395
自由度	2	2	2	2
方差	219.112	76.815	266.187	33.197
F	6.600	2.314	8.018	
显著性	>0.05	>0.05	>0.05	

2.5.1 验证实验 分别称取药材以最优的工艺提取,按“2.2”和“2.3”项下测定淫羊藿苷含量和三七中人参皂苷 R_{g_1} 的含量,测定总固体得率。验证3批结果差异无统计学意义。

3 讨论

淫羊藿苷含量测定时参照《中华人民共和国药典》2010版方法,由于复方组成的干扰,对流动项的比例进行了选择,调整为乙腈:水为28:72,就得到理想的峰形和保留时间。三七中人参皂苷 R_{g_1} 的含量测定时供试品溶液的制备方法进行了优选:1)以乙醇提取液取10 mL,蒸干加甲醇溶解并定容至10 mL;2)先将乙醇提取液取10 mL蒸干加20 mL水溶解,水溶液用水饱和的正丁醇液萃取3次,每次20 mL,弃水液,正丁醇液合并,用正丁醇饱和的水液60 mL洗涤正丁醇液,取正丁醇液蒸干,加甲醇溶解并定容至10 mL;3)先将乙醇提取液10 mL蒸干加20 mL水溶解,水溶液用水饱和的正丁醇萃取3次,每次20 mL,弃水液,正丁醇液合并,用正丁醇饱和的氨试液洗涤2次,每次20 mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和的水洗涤1次,每次60 mL,取正丁醇层,蒸干,用甲醇溶解并定容至10 mL。经比较第3种方法色谱图简洁,分离度好,保留时间合适,选择该方法为供试品溶液的制备方法。人参皂苷 R_{g_1} 的含量测定经比较,优选了流动相比例,以

流动相B为例,0~12 min为19,12~60 min为19~36;0~6 min为19,6~30 min为19~26;0~6 min为22,6~28 min为22~26;最终又改为比例0~6 min为21,6~28 min为21~26。

参考文献

[1] 孟宁,孔凯,李师翁.淫羊藿属植物化学成分及药理活性研究进展[J].西北植物学报,2010,30(5):1063-1073.
[2] 孙晓玲,短小群.淫羊藿苷及衍生物药理作用研究进展[J].华夏医学,2010,23(6):807-810.
[3] 李婵,王学美.淫羊藿苷药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2008,33(23):2727-2731.
[4] 谢青春,陈燕忠,吕竹芬,等.三七中人参皂苷 R_{g_1} 的提取及含量测定[J].中国医药导报,2010,7(34):40-41.
[5] 冯陆冰,潘西芬,孙泽玲.三七的药理作用研究进展[J].中国药师,2008,11(10):1185-1187.
[6] 谭银合,孙维广,谭弘.丹龙抗痈胶囊提取工艺研究[J].中国中医药信息杂志,2008,15(5):56-59.
[7] 中国药典委员会.中华人民共和国药典[M].2010版一部.北京:化学工业出版社,2010:306.
[8] 林雪英,黄君曦.高效液相色谱法测定前列舒乐胶囊中淫羊藿苷含量[J].海峡药学,2010,22(12):73-75.
[9] 叶咸钰,杨水新,曹恒斌.hPLC测定强筋合剂中淫羊藿苷的含量[J].浙江中医药大学学报,2010,34(6):920-921.
[10] 申强,吕竹芬,谢青春,等.高效液相法测定祛痹舒肩丸中淫羊藿苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(4):16-18.
[11] 毕晓黎,罗文汇,李素梅.HPLC-ELSD法测定三七止血胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):75-77.
[12] 王雁.不同商品规格三七中3种皂苷的高效液相色谱法含量测定[J].中药材,2005,28(1):33-34.
[13] 魏莉,杜奕,周浩.不同产地和生长年限三七花蕾中总皂苷及单体皂苷的含量测定[J].上海中医药杂志,2008,42(4):76-78.
[14] 姚育端,傅钰,蒋平,等.高效液相色谱法测定三七伤药片中3组分的含量[J].中国药房,2007,18(3):206-207.
[15] 于佳,刘瑶,张建玲,等.正交试验法优选舒郁煎膏水提工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(8):31-33.

(2013-04-28 收稿)